

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, 15/11, C07K 14/47, 14/65, 16/18, A61K 31/70, 38/17, 38/30, 39/395, G01N 33/68, C07H 21/04		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/32620 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Juli 1999 (01.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08405 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1998 (22.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 57 250.2 22. Dezember 1997 (22.12.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STÄNDKER, Ludger [DE/DE]; Dohmeyer Weg 25, D-30625 Hannover (DE). OBENDORF, Maik [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). KLING, Lothar [DE/DE]; Neckarpromenade 34, D-68167 Mannheim (DE). OPTIZ, Hans-Georg [DE/DE]; Netztal 46, D-69469 Weinheim (DE). MOSTAFAVI, Hossein [IR/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN FRAGMENTS AND THE UTILIZATION THEREOF (54) Bezeichnung: INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN FRAGMENTE UND IHRE VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention relates to peptides which are characterized in that the amino acid sequence parts thereof correspond to the amino acid sequence of insulin-like growth factor binding protein. The invention also relates to cyclic, glycosylated, phosphorylated, acetylated, amidated and/or sulfatized derivatives.</p> (57) Zusammenfassung <p>Peptide, dadurch gekennzeichnet, daß ihre Aminosäuresequenz Teilen der Aminosäuresequenz von Insulin-like growth factor binding protein entspricht sowie cyclische, glycosylierte, phosphorylierten, acetylierten, amidierten und/oder sulfatierten Derivate.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Insulin-like Growth Factor Binding Protein Fragmente und ihre Verwendung

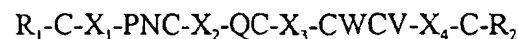
Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide mit zellproliferativen und zellprotektiven Eigenschaften, Komplexe der Peptide mit humanem Insulin-like growth factor I und II (IGF) sowie die damit in Verbindung stehenden Nucleinsäuren, Antisensenucleotide, Antikörper und Inhibitoren.

Insulin-like Growth Factor Binding Proteine sind unter anderem von Shimasaki, S. und Ling, N. in Prog. Growth Factor Res. 3 (1991) 243-266 und Zapf, J. in Eur. J. Endocrinol. 132 (1995) 645-654 beschrieben worden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide, deren Aminosäuresequenz Teilen der Aminosäuresequenz von Insulin-like Growth Factor Binding Proteinen entspricht sowie cyclische, glycosylierte, phosphorylierte, acetylierte, amidierte und/oder sulfatierte Derivate davon. Diese erfindungsgemäßen Peptide werden als IGFBP oder IBP bezeichnet.

Bevorzugte Peptide sind solche, die natürlicherweise vorkommen und beispielsweise aus Hämo-filtrat isoliert werden können. Vorzugsweise weisen die Peptide eine Länge von 61 bis 115 Aminosäuren auf. Besonders bevorzugt sind Peptide, die Sequenzen aufweisen, die N- oder C-terminalen Sequenzen von Insulin-like Growth Factor Binding Proteinen entsprechen.

Bevorzugte Peptide sind Peptide mit der Aminosäuresequenz der Formel



worin

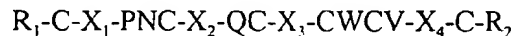
R_1 , NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend bis zu 41 Aminosäuren, X_1 , ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 24 bis 31 Aminosäuren,

- 2 -

X₂ ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 9 Aminosäuren, X₃ ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 10 Aminosäuren, X₄ ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 18 bis 24 Aminosäuren, R₂ COOH, CONH₂ oder ein Peptid mit bis zu 12 Aminosäuren darstellt und cyclische, glycosylierte, phosphorylierte, acetylierte, amidierte, sulfatierte Derivate sowie Fragmente mit der physiologischen Fähigkeit des IGFBP.

Das Peptid weist zellproliferative und zellprotektive Eigenschaften auf.

Die erfindungsgemäßen Peptide können Disulfidbrücken aufweisen, so daß sie der allgemeinen Formel



entsprechen.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die Peptide an einer oder mehrerer der folgenden Positionen der Aminosäuresequenz ein Glycin auf. X₂ an Position 4, X₃ an Position 9, X₄ an Position 4 oder 5 und/oder X₄ an Position 9 oder 10.

Es ist weiter bevorzugt, daß X₁ an der Position 8 L oder V ist und/oder X₁ an der Position 11 L oder I ist und/oder X₂ an der Position 1 D oder N ist und/oder X₂ an der Position 9 K oder R ist und/oder X₃ an der Position 3 S oder A ist und/oder an der Position 8 R oder A ist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird R₁ ausgewählt aus

APSEEDHSILWDAISTYDGSKALHVTNIKKWKEP (SEQ ID NO: 1),
 GGKHHGLGLEEPKKLRPPPARTP (SEQ ID NO: 2),
 GKGGKHHGLGLEEPKKLRPPPARTP (SEQ ID NO: 3),
 GHAKDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGP (SEQ ID NO: 4),
 KVNAPREDARPVPQGS (SEQ ID NO: 5),
 LTQSKFVGGGAENTAHPRIISAPEMRQEQGP (SEQ ID NO: 6),
 PQAGTARPDVNRRDQQRNPGTSTTPSQPNSAGVQDTEMGP (SEQ ID NO: 7) und/oder

X₁ ausgewählt aus

RIELYRVVESLAKAQETSGEEISKFYI (SEQ ID NO: 8),

- 3 -

QQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLHI (SEQ ID NO: 9),
RREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHI (SEQ ID NO: 10),
QSELHRALERLAASQSRTHEDLYIPI (SEQ ID NO: 11),
RRHMEASLQELKASPRMVPRAVYL (SEQ ID NO: 12),
RRHLDSVLQQLQTEVYRGAQTLYV (SEQ ID NO: 13) und/oder

X₂ ausgewählt aus

NKNGFYHSR (SEQ ID NO: 14),
DKHGLYNLK (SEQ ID NO: 15),
DKKGFYKKK (SEQ ID NO: 16),
DRNGNFHPK (SEQ ID NO: 17),
DRKGFYKRK (SEQ ID NO: 18),
DHRGFYRKR (SEQ ID NO: 19) und/oder

X₃ ausgewählt aus

ETSMDGEAGL (SEQ ID NO: 20),
KMSLNGQGE (SEQ ID NO: 21),
RPSKGRKRGF (SEQ ID NO: 22),
HPALDGQRGK (SEQ ID NO: 23),
KPSRGRKRGK (SEQ ID NO: 24),
RSSQGQRRGP (SEQ ID NO: 25) und/oder

x₄ ausgewählt aus

YPWNGKRIPGSPEIRGDPN (SEQ ID NO: 26),
NPNTGKLIQGAPTIRGDPE (SEQ ID NO: 27),
DKYGQPLPGYTTKGKEDVH (SEQ ID NO: 28),
DRKTGVKLPGGLEPKGELD (SEQ ID NO: 29),
DKYGMKLPGMEYVDGDFQ (SEQ ID NO: 30),
DRMGKSLPGSPDNGSSS (SEQ ID NO: 31) und/oder

R₂ ausgewählt aus

QIYFNVQN (SEQ ID NO: 32),
HLFYNEQQEARGVHTQRMQ (SEQ ID NO: 33),
HLFYNEQQE (SEQ ID NO: 34),
YSMQSK (SEQ ID NO: 35),
HQLADSFRE (SEQ ID NO: 36),
HTFDSSNVE (SEQ ID NO: 37),
PTGSSG (SEQ ID NO: 38).

Bevorzugte Peptide weisen folgende Sequenzen auf

- 4 -

IGFBP-1

APSEEDHSILWDAISTYDGSKALHVTNIKKWKEPCRIELYRVVESLAKAQETSGEEISKFYLP
NCNKNGFYHSRQCETSMGDGEAGLCWCVPWNGKRIPGSPEIRGDPNCQIYFNVQN (SEQ ID
NO: 39)

IGFBP-2

GKGGKHHGLGLEEPKKLRPPPARTPCQQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLHIPNCDKHG
LYNLKQCKMSLNGQRGECWCVPNTGKLIQGAPTIRGDPECHLFYNEQQEARGVHTQRMQ
(SEQ ID NO: 40)

GGKHHGLGLEEPKKLRPPPARTPCQQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLHIPNCDKHG
LYNLKQCKMSLNGQRGECWCVPNTGKLIQGAPTIRGDPECHLFYNEQQEARGVHTQRMQ
(SEQ ID NO: 45)

IGFBP-3

GHA KDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPNC
DKKGFYKKKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYGQPLPGYTTKGKEDVHCYSMQSK (SEQ ID NO:
41)

KVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPNC
DKKGFYKKKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYGQPLPGYTTKGKEDVHCYSMQSK (SEQ ID NO:
46)

HPLHSKIIIIKKGHAKDSQRY (SEQ ID NO: 47)

IGFBP-4

DEAIHCPPCSEKILARCRPPVGCEELVREPGCGCCATCALGLGMPCGVYTPRCGSGLRICYPPR
GVEKPLHTLMHGQGVCMELAEIEAIQESLQPSDKDEGDHPNNSFSPCSAHDRCLQKHFAKIR
DRSTSGGKM (SEQ ID NO: 48)

KVNGAPREDARPVPQGSCQSELHRALERLAASQSRTHEDLYIIPINCDRNGNFHPKQCHPAL
DGQRGKCWCVDRTKTVKLPGGLEPKGELDCHQLADSFRE (SEQ ID NO: 42)

IGFBP-5

LTQSKFVGGAENTAHPRIISAPEMRQSESEQGPCRRHMEASLQELKASPRMVPRAVYLPNCDRK
GFYKRKQCKPSRGRKRGICWCVDKYGMKLPMEYVDGDFQCHTFDSSNVE (SEQ ID NO:
43)

KFVGGAENTAHPRIISAPEMRQSESEQGPCRRHMEASLQELKASPRMVPRAVYLPNCDRK
GFYKRKQCKPSRGRKRGICWCVDKYGMKLPMEYVDGDFQCHTFDSSNVE (SEQ ID NO:
49)

HTRISELKAEAVKKDRRKKLTQS (SEQ ID NO: 50)

IGFBP-6

PQAGTARPQDVNRRDQQRNPGTSTTPSQPNSAGVQDTEMGPCRRHLDVQLQQLQTEVYRGAQT
LYVPNCDHRGFYRKRQCRSSQGQRRGPCWCVDRMGKSLPGSPDGNGSSSCPTGSSG (SEQ
ID NO: 44)

Die erfindungsgemäßen Peptide lassen sich durch Aufreinigung aus humanem Blutfiltrat oder Urin, durch Festphasenpeptidsynthese oder durch Expression in rekombinanten Mikroorganismen erhalten.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die Komplexe der erfindungsgemäßen Peptide mit humanem Insulin-like growth factor-I und/oder humanem Insulin-like growth factor-II sowie dessen physiologisch aktiven Fragmenten und/oder Derivaten, insbesondere amidierete, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte und/oder glykosylierte Derivate.

Gegenstand der Erfindung sind darüber hinaus Nucleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, Antisensenucleotide, die unter stringenten Bedingungen an eine Nucleinsäure binden, die für das erfindungsgemäße Peptid kodiert, Antikörper, die an die erfindungsgemäßen Peptide binden, Inhibitoren, die die biologische Aktivität der Insulin-like Growth Factor Binding Proteine hemmen, Inhibitoren, die die Expression von Insulin-like Growth Factor Binding Proteinen hemmen.

Die erfindungsgemäßen Peptide, Komplexe, Nucleinsäuren, Antisensenucleotide, Antikörper und Inhibitoren eignen sich insbesondere zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Über- oder Unterexpression von Insulin-like Growth Factor Binding Proteine, zur Behandlung von Muskelschwund, Osteoporose, Diabetes, amyloider lateraler Sklerose, peripheren und zentralen Neuropathien, entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen, Wachstumsstörung, Erkrankung der Muskulatur, Erkrankung des Knochenapparates und/oder zur Wund- und Knochenheilung.

Insbesondere Komplexe von IGFBP mit IGF-I oder IGF-II eignen sich zur Behandlung von Knochenerkrankungen.

Die erfindungsgemäßen Peptide und die Komplexe der Peptide mit Insulin-like growth factor weisen eine zellproliferative Aktivität auf.

Die erfindungsgemäßen Peptide regulieren die Freisetzung des IGF-I und IGF-II aus den Komplexen an ihrem Wirkort. Die Coadministration der erfindungsgemäßen Peptide mit IGF-I oder IGF-II verlängert die biologische Halbwertszeit und damit die Verfügbarkeit der letztgenannten. Die durch Injektion von freiem IGF-I oder IGF-II induzierte Hypoglykämie wird durch die Coadministration der erfindungsgemäßen Peptide verhindert.

Die erfindungsgemäßen Peptide haben desweiteren eine wachstumsfördernde Wirkung auf Knochenzellen und führen zu einer Verstärkung oder Modulation der Wirkung von Wachstumshormonen.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Peptide, Komplexe, Nucleinsäuren, Antisensenucleotide, Antikörper und Inhibitoren in einer pharmazeutisch üblichen Darreichungsform in einem Arzneimittel enthalten. Sie eignen sich zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen Anwendung oder als Aerosol zur transpulmonalen Applikation. Die Menge an zu verabreichenden Peptid beträgt 1 µg bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren und/oder Antisensenucleotide eignen sich auch zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung somatischer oder nicht-somatischer Generkrankungen.

Das erfindungsgemäße Diagnostikum enthält die erfindungsgemäßen Peptide, Komplexe, Nucleinsäuren, Antisensenucleotide, Antikörpern und/oder Inhibitoren.

Bevorzugterweise enthält das Diagnostikum poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid, wobei die Antikörper fluoreszenz- oder radioaktiv-markiert sein können, um in den bekannten ELISA oder RIA eingesetzt werden zu können. Jedoch kann das Diagnostikum auch Nucleinsäuren enthalten, die in modifizierter oder markierter Form in dem Fachmann bekannten Tests wie PCR oder Finger-Printing zum Einsatz kommen.

Die erfindungsgemäßen Diagnostikmittel eignen sich insbesondere zur Diagnose von Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-

Darm-Traktes, des Immunsystems, von Diabetes, inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei Krebs.

Insbesondere das gleichzeitige Auftreten mehrerer Fragmente von BP-4 oder BP-5 im Plasma, insbesondere der N- und C-terminalen Domänen eignet sich als Marker für Erkrankungen des Knochenstoffwechsels. Die entsprechenden Peptide können entweder massenspektroskopisch nachgewiesen oder, bevorzugt durch Immunreaktion mit entsprechenden Antikörper.

Figur 1 zeigt ein Alignment der Konsensussequenzen von C-terminalen Fragmenten der Insulin-like Growth Factor Proteine.

Figur 2 zeigt die schematische Struktur der Insulin-like Growth Factor Proteine mit den cysteinreichen N- und C-terminalen Domänen.

Figur 3 zeigt die schematische Struktur der Insulin-like Growth Factor Proteine sowie die Sequenz der aus Hämofiltrat isolierten biologisch aktiven Fragmente.

Figur 4 zeigt die Isolierung des osteoanabolen Faktors IGFBP-4-11 aus humanem Hämofiltrat (siehe Beispiel 3).

Figur 5 zeigt die Sequenz- und Schwefelbrückenanalyse des osteoanabolen Faktors IGFBP-4-11. Die Cysteine 153-183, 194-205 und 207-228 sind verbrückt.

Figur 6 zeigt die biologische Wirkung des osteoanabolen Faktors IGFBP-4-11. Nach einer Inkubation von serumfrei gehaltenen primären Rattenosteoblasten für (A) 24 Stunden, (B) 48 Stunden und (C) 72 Stunden mit IGFBP-4-11 zeigt sich die proliferationsfördernde Wirkung des IGFBP-4-11. In dosisabhängiger Weise wird ein Anstieg der DNA-Syntheserate gefunden, gemessen als Einbau von Bromodesoxyuridin (BrdU).

Figur 7 zeigt die spezifische Bindung an Osteoblasten und den möglichen Rezeptor für den osteoanabolen Faktor IGFBP-4-11 (als IGFBP-4¹³⁶⁻²³⁷ bezeichnet). A: Radioaktiv markiertes IGFBP-4-11 zeigt eine durch steigende Mengen an nicht-markiertem IGFBP-4-11 verdrängbare spezifische Bindung an primäre Osteoblastenzellen. B: Radioaktiv markiertes IGFBP-4-11 konnte, nachdem es an Osteoblasten gebunden hat, chemisch mit seinem putativen Rezeptormolekül vernetzt werden und anschließend durch Gelelektrophorese und nachfolgende Autora-

diographie nachgewiesen werden. Der Ligand-Rezeptor-Komplex hat ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa. Die Bildung des Komplexes wird begünstigt durch Saponin, einen Membranporenbildner. Die Komplexbildung wird verhindert durch Zusatz eines Überschusses an nicht-markiertem IGFBP-4-11 zum Inkubationsansatz.

Die Aufreinigung des erfindungsgemäßen Peptids bzw. seine Komplexes wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

Aufreinigung und peptidchemische Analyse des IGFBP-2-13

Die erfindungsgemäßen Peptide sind durch ein Reinigungsverfahren ausgehend vom humanem Hämofiltrat erhältlich. Dieses patentierte Verfahren (Forssmann, W.-G. (1988), Offenlegungsschrift DE 36 33 707 A1), welches für die Gewinnung von Eiweißstoffen aus Hämofiltrat entwickelt wurde, wurde in modifizierter Form auch zur Aufreinigung des Peptidkomplexes eingesetzt.

Hämofiltrat-Batch-Extraktion

Hämofiltrat fällt bei der Ultrafiltration des Blutes von Nierenkranken in großen Mengen an. 800 bis 1.000 l Hämofiltrat werden mit HCl auf einen pH-Wert von 2,7 eingestellt und mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 5,5 mS/cm verdünnt und mit einer Flußrate von 3 l/min auf einen starken Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	Vantage VA 250 (Amicon, Witten)
Säulenmaterial:	Fractogel TSK SP 650 (M), 25 cm x 20 cm
Fluß:	3 l/min
Detektion:	280 nm, pH, Leitfähigkeit
Puffer A:	Hämofiltrat pH 2,7, Leitfähigkeit 5,5 mS/cm
Puffer B:	0,5 M Ammoniumacetat
Anlage:	Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftragung der insgesamt 1.000 l Flüssigkeit über Nacht wird mit mehreren Säulenvolumina 5 mM HCl gespült. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgt als Batch-Elution mit 0,5

M Ammoniumacetat. Hierbei wird eine komplette Elution der Peptide über steigenden pH-Wert (6,8 bis 7,2) und steigende Leitfähigkeit (56 mS/cm) in etwa 5 l Eluat erreicht.

Erste präparative Auftrennung

Die Ammoniumacetat-Eluate der Batch-Extraktion werden in Mengen von 5.000 bis 10.000 l Hämofiltrat-Peptid vereinigt. Nach pH-Einstellung auf 2,7 wird das Peptidextrakt unter Zumischung von VE-Wasser mit einer Leitfähigkeit von 5,5 mS/cm auf den präparativen Kationenaustauscher aufgetragen.

Chromatographiebedingungen:

Säule: Vantage 250 VA
 Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M), 25 cm x 20 cm
 Fluß: bis zu 3 l/min während des Auftrages,
 0,5 bis 1 l während der Elution
 Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit
 Probe: Hämofiltrat pH 2,7, Leitfähigkeit 5,5 mS/cm
 Anlage: Autopilot Chromatographiesystem,
 (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden)

Nach Auftrag des Rohextraktes über 240 min wird die Säule mit 0,01 M HCl gespült, bis die Leitfähigkeit unter 1 mS/cm ist. Die Elution erfolgt dabei in mehreren Stufen mit den im folgenden angegebenen Puffern

Puffer	pH-Wert	Puffersubstanzen	Leitfähigkeit (mS/cm)
Waschpuffer	2,0	0,01 M HCl	1
Elutionspuffer 1:	3,6	0,1 M Zitronensäure-1-hydrat	2,9
Elutionspuffer 2:	4,5	0,1 M Essigsäure + 0,1 M Natriumacetat	4,0
Elutionspuffer 3:	5,0	0,1 M Äpfelsäure	6,2
Elutionspuffer 4:	5,6	0,1 M Bernsteinsäure	6,1
Elutionspuffer 5:	6,6	0,1 M NaH ₂ PO ₄	4,9
Elutionspuffer 6:	7,4	0,1 M NaH ₂ PO ₄	6,7
Elutionspuffer 7:	9,0	0,1 M Ammoniumcarbonat	6,7

Die Eluate 1-7 werden als pH-Pool I-VII bezeichnet. Sie werden separat gesammelt und abschließend mit VE-Wasser gespült. Die Elution erfolgt bis zum Erreichen einer neuen Basisli-

nie, wobei für die einzelnen pH-Pools I bis VII Elutionsvolumina von 10 bis 25 l erreicht werden.

Zweite präparative Auftrennung:

Die einzelnen pH-Pools werden zur Fraktionierung und gleichzeitigen Entsalzung über eine Reverse Phase Chromatographie getrennt

Chromatographiebedingungen:

Säule:	FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg)
Säulenmaterial:	Source RPC, 15 µm 10 x 12,5 cm (FineLine 100)
Fluß:	150 mL/min (FineLine 100)
Detektion:	280 nm, Leitfähigkeit, pH
Puffer A:	10 mM HCl
Puffer B:	80% Acetonitril in 10 mM HCl
Gradient:	0 bis 60% Puffer B in 5 Säulenvolumen

Nach Auftrag der pH-Pools wird die Säule mit Puffer A gespült. Während der Elution werden Fraktionen zu 200 ml gesammelt. Aliquots der Fraktionen werden im Bioassay getestet. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die im Assay bioaktiven Fraktionen 11 und 12 aus pH-Pool V wurden über eine semipräparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktionen 21 bis 25 enthielten die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	4,7 cm x 30 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	Vydac RP-C18 15-20 µm, 300 Å
Puffer A:	0,1% TFA
Puffer B:	0,1% TFA, 80% Acetonitril
Gradient:	5 bis 50% B in 45 min, 50 bis 100% B in 10 min
Fluß:	42 ml/min
Detektion:	214 nm und 280 nm
Chromatographieranlage:	BioCad
Fraktionen:	à 1,5 min ab Start des Gradienten

Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die bioaktiven Fraktionen 21 bis 25 aus der vorhergehenden Chromatographie wurden über die gleiche semipräparative Reverse Phase Säule aufgetrennt. Als Laufmittel wurde jedoch Methanol verwendet. Die Fraktion 24 enthielt die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	4,7 cm x 30 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	Vydac RP-C18 15-20 µm, 300 Å
Puffer A:	0,1% TFA, 20% Methanol
Puffer B:	0,1% TFA, 100% Methanol
Gradient:	0 bis 20% B in 6,5 min, 20 bis 80% B in 55 min, 80 bis 100% B in 13 min
Fluß:	30 ml/min
Detektion:	214 nm und 280 nm
Chromatographieanlage:	BioCad
Fraktionen:	à 1,5 min ab Start des Gradienten

Kationenaustauschchromatographie:

Die bioaktiven Fraktionen 19 und 20 aus der vorhergehenden Chromatographie wurden über eine Kationenaustauscher-Säule aufgetrennt. Die Fraktionen 45 bis 47 enthielten die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	1 cm x 5 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	Pepkat, Biotek 5 µm, 300 Å
Puffer A:	20 mM Natriumphosphat, pH 3,0
Puffer B:	20 mM Natriumphosphat, pH 3,0, 1,5 M NaCl
Gradient:	0 bis 50% B in 50 min, 50 bis 100% B in 10 min
Fluß:	3 ml/min
Detektion:	280 nm
Chromatographieranlage:	BioCad Sprint
Fraktionen:	à 1,5 min ab Start des Gradienten

Analytische Reverse-Phase Chromatographie:

Die bioaktiven Fraktionen 45 bis 47 aus der vorhergehenden Chromatographie wurden sukzessive in mehreren identischen Läufen über eine Reverse Phase - Säule aufgetrennt. Die Fraktion 56 enthielt die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	1 cm x 25 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	Vydac RP-C18 5 µm, 300 Å
Puffer A:	0,1% TFA
Puffer B:	0,1% TFA, 80% Acetonitril
Gradient:	5 bis 50% B in 45 min, 50 bis 100% B in 10 min
Fluß:	2 ml/min
Detektion:	220 nm
Chromatographieranlage:	Kontron
Fraktionen:	à 1 min ab Start des Gradienten

Zweite Analytische Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die bioaktive Fraktion 56 aus dem vorhergehenden Trennschritt wurde auf einer analytischen Reverse-Phase Säule weiter aufgereinigt.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	0,46 cm x 25 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	YMC RP-C18, 5 µm, 300 Å
Puffer A:	0,1% TFA
Puffer B:	0,1% TFA, 80% Acetonitril
Gradient:	15 bis 50% B in 75 min, 75 bis 100% B in 10 min
Fluß:	0,7 ml/min
Detektion:	214 nm
Chromatographieranlage:	Kontron

Dritte Analytische Reverse-Phase C3-Chromatographie:

Ein Teil der bioaktiven Fraktion 45 aus dem vorhergehenden Trennschritt wurde direkt der Massen- und Sequenzanalyse unterzogen. Ein anderer Teil wurde reduziert und alkyliert (wie unter Beispiel 2 beschrieben) und dann auf einer analytischen Reverse-Phase Säule weiter aufgereinigt.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	0,1 cm x 15 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	Zorbax RP-C3, 5 µm, 300 Å Analytik verwandt wird, deutlich.

Massenbestimmungen

Alle Massenbestimmungen der unmodifizierten und modifizierten Peptide wurden auf einem MALDI-TOF Massenspektrometer durchgeführt. Die Molekülmassen der Peptide wurden als

IGF-II, 7471 Da;

IGFBP-2, 12 681 Da;

IGFBP-2, 12 865 Da

bestimmt.

Bestimmung von Cysteinen/Modifizierung von Peptiden

Cysteine lassen sich nach vorheriger chemischer Derivatisierung, zum Beispiel nach Reduktion mit β -Mercaptoethanol und Carboxamidomethylierung mit Iodacetamid, in der Peptid-Sequenzierung nachweisen. Nach der Derivatisierung schließt sich eine Entsalzung vorzugsweise über eine analytische Reverse-Phase Chromatographie mit einer Vydac RP-C18 Säule (4,6 mm x 25 cm) an. Ein Teil der so modifizierten Peptide werden der Sequenzanalyse zugeführt, mit dem anderen Teil ergeben die Massenbestimmungen ein entsprechendes Molekulargewicht. Aus der Massendifferenz zum nativen Peptid wird geschlossen, daß die Peptide aus Hämofiltrat sechs Cysteine enthalten, welche zudem mit drei Disulfidbrücken untereinander verbunden sind.

Sequenzbestimmung

Sowohl die aufgereinigten nativen als auch die carboxamidomethylierten Peptide werden mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert.

Die Proben werden auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Massenbestimmungen ergaben sich folgende N-terminale Sequenzen:

IGFBP-2-13, MW 12681

(reduziertes und mit Jodacetamid modifiziertes Molekül, MW 13045)

Aminosäuren

GGKHHLGLEEPKKLRPPPARTPCQQELDQV...

IGFBP-2-13, MW 12865

(reduziertes und mit Jodacetamid modifiziertes Molekül, MW 13223)

Aminosäuren

GKGGKHHLGLEEPKKLRPPPARTPCQQELDQV...

IGF-II, MW 7471

Aminosäuren

AYRPSETLCGGEL....

Der C-Terminus wurde durch den Vergleich der gemessenen Molekularmasse mit der aus der Sequenz berechneten Masse bestimmt. Die Übereinstimmung dieser Massen liegt in der Meßgenauigkeit des MALDI-TOF-Massenspektrometers von 0,1% der Gesamtmasse.

Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nucleinsäure Datenbanken durchgeführt. Die Peptidsequenzen besitzt eine hundertprozentige Identität zu den aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren des humanen IGFBP-2 bzw. zur Aminosäuresequenz von IGF-II.

IGFBP-2 wurde bisher als ein 34 kD großes Bindungsprotein beschrieben, dessen vollständige Sequenzanalyse durch Analyse der zugehörigen cDNA (Binkert, C. et al., EMBO Journal Vol. 8 (1989), Seiten 2497 bis 2502) erfolgte. IGF-II und auch IGF-I, welches ebenfalls an IGFBP-2 bindet, wurden dagegen in ihrer Struktur auf Protein- und DNA-Sequenzebene schon umfangreich beschrieben (als Review: Rechler, M.M., & Nissley, S.P. (1990) Insulin-like growth factors In: Peptide growth factors and their receptors (Spori, M.B., Roberts, A.B. eds.), Seiten 263 bis 367, Springer-Verlag, Berlin).

Beispiel 2

Bestimmung der biologischen Aktivität des IGF/IGFBP-2-13

Die Isolierung des IGF/IGFBP-2-13 erfolgte anhand seiner biologischen Aktivität in einem Überlebensassay der PC-12 (Pheochromocytom-Zellen)-Zelllinie. Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen gefriergetrocknet und anschließend dem biologischen Assay zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Aufreinigung unterzogen.

Der Assay mißt das Überleben der Zellen, nachdem sie serumfrei gehalten wurden, indem 24 Stunden nach Serumentzug die Aktivität mitochondrialer Enzyme bestimmt wird. Als Positivkontrolle wird in diesem Assay Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt.

In 96 Loch-Platten werden 10.000 PC-12 Zellen pro Loch in serumfreien Medium ausgesät. Es erfolgt die Zugabe von Aliquots (ca. 100 ml Äquivalent des Ausgangsmaterials) in die wells. 20 Stunden später wird die Überlebensrate der Zellen mittels eines Wst-1 Substrats gemessen. Dieses Substrat wird von mitochondrialen Enzymen umgesetzt. Die entstehende Farbstoffintensität wird bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen, die Referenzwellenlänge liegt dabei bei über 600 nm.

Der IGF/IGFBP-2-13 Komplex besitzt in dosisabhängigerweise eine überlebensfördernde Wirkung auf PC-12 Zellen. Diese Zellen entsprechen neuronalen Vorläuferzellen, so daß man davon ausgehen kann, das IGF/IGFBP-2-13 ein neuroprotektiver Faktor ist.

Beispiel 3

Aufreinigung des erfindungsgemäßen Peptids IGFBP-4-11

Die Aufreinigung des erfindungsgemäßen Peptid IGFBP-4-11 erfolgte bis zur Stufe der zweiten präparativen Auftrennung völlig analog zu der unter Beispiel 1 beschriebenen Aufreinigung des IGFBP-2-13. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch

Analytische Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Die im Assay bioaktive Fraktion 33 aus pH-Pool IV wurden über eine analytische Reverse-Phase-Säule aufgetrennt. Die Fraktion 34 enthielt die erfindungsgemäße Substanz.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	1 cm x 25 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	Vydac RP-C4 5 μ m, 300 Å
Puffer A:	0,1% TFA
Puffer B:	0,1% TFA, 80% Acetonitril
Gradient:	0 - 80% B in 80 min, 80 - 100% B in 10 min
Fluß:	2,5 ml/min
Detektion:	230 nm
Chromatographieranlage:	Kontron
Fraktionen:	à 1 min ab Start des Gradienten

Massenbestimmungen

Die Massenbestimmungen wurden auf einem Elektrospray-Massenspektrometer durchgeführt. Die Molekülmasse des Peptids wurde als

IGFBP-4-11, 11 344 Da

bestimmt.

Sequenzbestimmung

Die Aminosäuresequenz des aufgereinigten, nativen, biologisch aktiven Peptids IGFBP-4-11 wurde wie unter Beispiel 1 auf der Seite 13 beschrieben durchgeführt.

Es ergab sich die folgende N-terminale Sequenz:

IGFBP-4-11, MW 11344 Da

KVNGAPREDARPVPQGSXQSELIIRALERL...

Der C-Terminus wurde durch den Vergleich der gemessenen Molekularmasse mit der aus der Sequenz berechneten Masse bestimmt. Die Übereinstimmung dieser Massen liegt in der Messgenauigkeit des Elektrospray-Massenspektrometers von 0,1% der Gesamtmasse.

Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nucleinsäuredatenbanken durchgeführt. Die Peptidsequenz besitzt eine hundertprozentige Identität zu den aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren des humanen IGFBP-4.

Bestimmung der Schwefelbrückenverknüpfung des IGFBP-4-11

Die Analyse der Schwefelbrückenverknüpfung erfolgte, indem das native Peptid IGFBP-4-11 parallel in zwei verschiedenen Ansätzen mit den Endoproteasen Chymotrypsin und Arg-C gespalten wurde. Die erhaltenen Spaltfragmente wurden dann mittels analytischer Reverse Phase Chromatographie voneinander getrennt und der Molekularmassen- und Sequenzanalyse unterzogen. Folgende Fragmente, welche jeweils zwei Cysteine und eine Schwefelbrücke enthalten, wurden erhalten:

HPKQCHPALDGQRGKCW, MW 1960

CVDRKTGVKLPGGLEPKGELDCHQLADSF, MW 3112

PVPQGSCQSELHR

MW 3236

THEDLYIIPNCDR

Daraus ist ersichtlich, daß im nativen IGFBP-4-11 die Schwefelbrücken zwischen Cystein 1 und 2, zwischen Cystein 3 und 4 sowie zwischen Cystein 5 und 6 ausgebildet sind.

Beispiel 4

Bestimmung der biologischen Aktivität des IGFBP-4-11

Die Isolierung des IGFBP-4-11 erfolgte anhand seiner biologischen Aktivität in einem Proliferationsassay mit primären Knochenzellen (Osteoblasten), die zunächst aus Schädeldecken von Rattenembryonen isoliert werden

Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 3 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen gefriergetrocknet und anschließend dem biologischen Assay zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Aufreinigung unterzogen. Der Assay mißt die Proliferation der Zellen, indem 48 oder 72 Stunden nach Zugabe der Fraktionen der Einbau von radioaktivem Thymidin, also die DNA-Syntheserate, bestimmt wird. Als Positiv-Kontrolle wird in diesem Assay Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) oder fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt. In 96 Loch-Platten werden 5.000 Osteoblasten-Zellen pro Loch in serumhaltigem Medium ausgesät. Es erfolgt die Zugabe von Aliquots (ca. 100 µl Äquivalent des Ausgangsmaterials) in die wells. 48 oder 72 Stunden später wird die Proliferationsrate (DNA-Syntheserate) der Zellen mittels der Zugabe und des Einbaus von radioaktivem Thymidins gemessen. Das Peptid IGFBP-4-11 besitzt in dosisabhängigerweise eine proliferationsfördernde Wirkung auf diese primären Osteoblasten. Diese Zellen entsprechen typischen Knochenzellen, so daß man davon ausgehen kann, das IGFBP-4-11 ein osteoanaboler Faktor ist.

Beispiel 5

Isolierung der C-terminalen Domäne des IGFBP-3

Durch ein ähnliches Verfahren wie in den Beispielen 1 und 3 konnte aus Hämofiltrat ein Peptid isoliert werden mit einer Masse von 2.470 Dalton (MALDI:2481 Dalton) mit der Sequenz:

HTRISELKAEAVKKDRRKLTQS (?)

wodurch sich als IGFBP-3 C-terminale Sequenz folgende Sequenz ergibt:

KVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPNC
DKKGFYKKKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYGQPLPGYTTKGKEDVHCYSMQSK

Beispiel 6

Durch ein ähnliches Verfahren wie in den Beispielen 1 und 3 konnte die N-terminale Domäne des IGFBP-4 mit der Sequenz

DEAIHCPPCSEELARCRPPVGCEELVREPGCGCCATCALGLGMPCGVYTPRCGSL
RCYPPRGVEKPLHTLMHGQGVCMELAEIEAIQESLQPSDKDEGDHPNNSFSPCSAHD
RRCLQKHFAKIRDRSTSGGKM

Beispiel 7

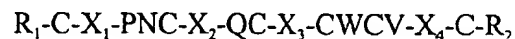
Bestimmung der C-terminalen Sequenz des IPB-5 durch ein Verfahren wie in den Beispielen 1 und 3 konnte ein Peptid mit einer Masse von 13,5 kD bestimmt werden. Die Sequenzbestimmung ergab folgende Sequenz:

KFVGGAENTAHPRIISAPEMRQESEQGPCRRHMEASLQELKASPRMVPRAVYLPNCD
RKGfYKRKQCKPSRGRKRGICWCVDKYGMKLPGMEYVDGDFQCHTFDSSNVE

Die theoretische Masse beträgt 12,5 kD, daher ist davon auszugehen, daß das Peptid an Serin oder Theronin glykosyliert ist.

Patentansprüche

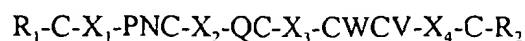
1. Peptide, dadurch gekennzeichnet, daß ihre Aminosäuresequenz Teilen der Aminosäuresequenz von Insulin-like growth factor binding protein entspricht sowie cyclische, glycosylierte, phosphorylierten, acetylierten, amidierten und/oder sulfatierten Derivate.
2. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide aus Hämofiltrat isoliert werden können.
3. Peptide nach einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide eine Länge von 61 bis 115 Aminosäuren aufweisen.
4. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide Sequenzen aufweisen, die N- oder C-terminalen Sequenzen von Insulin-like growth factor binding protein entsprechen.
5. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einer Aminosäuresequenz der Formel



worin

R_1 NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend bis zu 41 Aminosäuren, X_1 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 24 bis 31 Aminosäuren, X_2 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 9 Aminosäuren, X_3 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 10 Aminosäuren, X_4 ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz umfassend 18 bis 24 Aminosäuren, R_2 $COOH$, $CONH_2$ oder ein Peptid mit bis zu 12 Aminosäuren darstellt und cyclische, glycosylierte, phosphorylierte, acetylierte, amidierte, sulfatierte Derivate sowie Fragmente mit der physiologischen Fähigkeit des IGFBP.

6. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 mit Disulfidbrücken der Formel



7. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß X_2 an Position 4 seiner Aminosäuresequenz ein Glycin aufweist und/oder X_3 an der Position 9 seiner Aminosäuresequenz ein Glycin aufweist und/oder X_4 an der Position 4 oder 5 seiner Aminosäuresequenz ein Glycin aufweist und/oder X_4 an der Position 9 oder 10 seiner Aminosäuresequenz ein Glycin aufweist.
8. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß X_1 an der Position 8 oder V ist und/oder X_1 an der Position 11 oder I ist und/oder X_2 an der Position 1 D oder N ist und/oder X_2 an der Position 9 K oder R ist und/oder X_3 an der Position 3 S oder A ist und/oder an der Position 8 R oder A ist.
9. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß R_1 ausgewählt wird aus

APSEEDHSILWDAISTYDGSKALHVTNIKKWKEP,
 GGKHHLGLEEPKKLRPPPARTP
 GKGGKHHLGLEEPKKLRPPPARTP,
 GHAKDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGP,
 KVNGAPREDARPVPQGS,
 LTQSKFVGGAENTAHPRIISAPEMRQESEQGP,
 PQAGTARPDQVNRDQQRNPGTSTTPSQPNSAGVQDTEMGP.

10. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß X_1 ausgewählt wird aus

RIELYRVVESLAKAQETSGEEISKFYI,
 QQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLHI,
 REMEDTLNHLKFLNVLSRPGVHI,
 QSELHRALERLAASQSRTHEDLYIPI,
 RRHMEASLQELKASPRMVPRAVYL,
 RRHLDSVLQQLQTEVYRGAQTLYV.

11. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß X_2 ausgewählt wird aus

NKNGFYHSR,
 DKHGLYNLK,
 DKKGFYKKK,
 DRNGNFHPK,
 DRKGFYKRK,

DHRGFYRKR.

12. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß X_3 ausgewählt wird aus

ETSM DGEAGL,
KMSLNGQRGE,
RPSKGRKRGF,
HPALDGQRGK,
KPSRGRKRGI,
RSSQGQRRGP.

13. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß X_4 ausgewählt wird aus

YPWNGKRIPGSPEIRGDPN,
NPNTGKLOQGAPTIRGDPE,
DKYGQPLPGYTTKGKEDVH,
DRKTGVKLPGGLEPKGELD,
DKYGMKLPGMEYVDGDFQ,
DRMGKSLPGSPDGNGSSS.

14. Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß R_2 ausgewählt wird aus

QIYFNVQN,
HLFYNEQQEARGVHTQRMQ,
HLFYNEQQE,
YSMQSK,
HQLADSFRE,
HTFDSSNVE,
PTGSSG.

15. Peptide gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide ausgewählt werden aus

IBP-1

APSEEDHSILWDAISTYDGSKALHVTNIKKWKEPCRIEL YRVVESLAKAQETS
GEEISKFYLPNCNKNFYHSRQCETSM DGEAGLCWCVYPWNGKRIPGSPEIRG
DPNCQIYFNVQN

IGFBP-2

GKGGKHHLGLEEPKKLRPPPARTPCQQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYS
LHIPNCDKHGLYNLKQCKMSLNGQRGECWCVPNTGKLIQGAPTIRGDPECH
LFYNEQQEARGVHTQRMQ

GGKHHLGLEEPKKLRPPPARTPCQQELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLH
IPNCDKHGLYNLKQCKMSLNGQRGECWCVPNTGKLIQGAPTIRGDPECHLF
YNEQQEARGVHTQRMQ

IGFBP-3

GHAKDSQRYKVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNV
LSPRGVHIPNCDKKGFYKKKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYGQPLPGYTTKGK
EDVHCYSMSQSK

KVDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCRREMEDTLNHLKFLNVLSPRGV
HIPNCDKKGFYKKKQCRPSKGRKRGFCWCVDKYGQPLPGYTTKGKEDVHCY
SMQSK

HPLHSKIIIIKKGHAKDSQRY

IGFBP-4

DEAIHCPPCSEEKLARCRPPVGCEELVREPGCGCCATCALGLGMPCGVYTPRC
GSGLRCPYPRGVEKPLHTLMHGQGVCMELAEIAIQESLQPSDKDEGDHPNNS
FSPCSAHDRRCLQKHFAKIRDRSTSGGKM

KVNGAPREDARPV PQGSCQSELHRALERLAASQSRTHEDLYIIPNCDRNGNF
HPKQCHPALDGQRGKCWCVDRKTGVKLPGGLEPKGELDCHQLADSFRE

IGFBP-5

LTQSKFVGGAENTAHPRIISAPEMRQESEQGPCRRHMEASLQELKASPRMVPR
AVYLPNCDRKGFYKRKQCKPSRGRKRGICWCVDKYGMKLPGMEYVDGDFQ
CHTFDSSNVE

KFVGGAENTAHPRIISAPEMRQESEQGPCRRHMEASLQELKASPRMVPR
YLPNCDRKGFYKRKQCKPSRGRKRGICWCVDKYGMKLPGMEYVDGDFQCH
TFDSSNVE

HTRISELKAEAVKKDRRKLTQS

IGFBP-6

PQAGTARPDVNRRDQQRNPGTSTTPSQPNSAGVQDTEMGPCRRHLDVSLQQ
LQTEVYRGAQTI.YVPNCDHRGFYKRKQCRSSQGQRRGPCWCVDRMGKSLPG
SPDGNGSSSCPTGSSG

16. Verfahren zur Herstellung der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 durch Aufreinigung aus humanem Blutfiltrat oder Urin, durch Festphasenpeptid-synthese oder durch Expression in rekombinanten Mikroorganismen.

17. Komplexe von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 mit hIGF-I (humaner Insulin-like growth factor-I, MW 7649) oder hIGF-II (humaner Insulin-like growth factor-II, MW 7491) sowie dessen biologisch aktive Fragmenten und/oder Derivaten, insbesondere amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten und/oder glykosylierten Derivaten.
18. Nucleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 kodiert.
19. Antisensenucleotid, dadurch gekennzeichnet, daß es unter stringenten Bedingungen eine Nucleinsäuresequenz bindet, die für ein Peptid gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 kodiert.
20. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er an ein Peptid gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 bindet.
21. Inhibitor, dadurch gekennzeichnet, daß er die biologische Aktivität von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 hemmt.
22. Inhibitor, dadurch gekennzeichnet, daß er die Expression von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 hemmt.
23. Verwendung von Peptiden gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, Komplexen gemäß Anspruch 17, Nucleinsäuren gemäß Anspruch 18, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Unterexpression von Insulin-like Growth Factor Binding Proteinen.
24. Verwendung von Antisensenucleotiden gemäß Anspruch 19, Antikörpern gemäß Anspruch 20, Inhibitoren gemäß Anspruch 21 und/oder Inhibitoren gemäß Anspruch 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Überexpression Insulin-like Growth Factor Binding Proteinen.
25. Arzneimittel enthaltend Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, Komplexe gemäß Anspruch 17, Nucleinsäuren gemäß Anspruch 18, Antisen-

- senucleotiden gemäß Anspruch 19, Antikörpern gemäß Anspruch 20, Inhibitoren gemäß Anspruch 21 und/oder Inhibitoren gemäß Anspruch 22 in einer pharmazeutisch üblichen Darreichungsform zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, intrathekalen Anwendung oder als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
26. Verwendung eines Arzneimittels gemäß Anspruch 25 zur Behandlung von Muskelschwund, Osteoporose, Diabetes, amyloider lateraler Sklerose, peripheren und zentralen Neuropathien, entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen, Wachstumsstörung, Erkrankung der Muskulatur, Erkrankung des Knochenapparates und/oder zur Wund- und Knochenheilung. ..
27. Verwendung der Nucleinsäure gemäß Anspruch 18 und/oder der Antisensenucleotide gemäß Anspruch 19 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung somatischer oder nicht-somatischer Generkrankungen.
28. Diagnostikmittel enthaltend Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, Komplexe gemäß Anspruch 17, Nucleinsäuren gemäß Anspruch 18, Antisensenucleotide gemäß Anspruch 19, Antikörpern gemäß Anspruch 20, Inhibitoren gemäß Anspruch 21 und/oder Inhibitoren gemäß Anspruch 22 sowie weitere Hilfsmittel.
29. Verwendung der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 28 zur Diagnose von Funktionsstörungen des Knochens, der Muskeln, des Nervensystems, der Lymphorgane, des Magen-Darm-Traktes, des Immunsystems, von Diabetes, inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei Krebs.

- 1/9 -

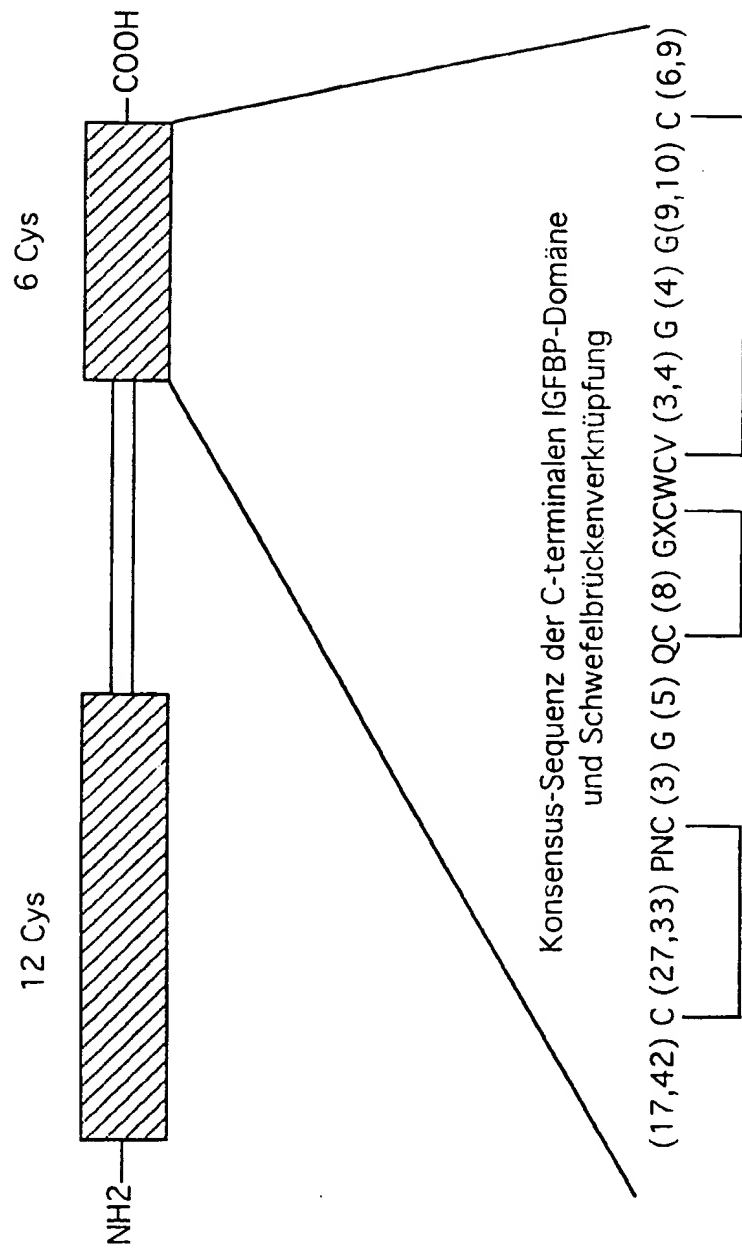
i bp1n	1	APSEEDHSILHDAISTYDGSKDLHUTHIKKUKKEPCRIELVAVUESLAK	AEITSG	EEISKFYLPNCNRNG
i bp2	1	CKGCKHHLGLEEPKKLQPPPARTPCQQLDQULERISTNALPDERGPLEHCLYSLHIPNCCKHG		
i bp3	1	GHAKDSQBYXUDYESQSTDTQNFSSSESKRETEYGPCCRREEDTLNHLKF	LNULSP	RGUHT
i bp4	1	KUNGNPREDAARPUPQGSQSELHRALELRA	SQSQTH	EDLYIPIPNCDRNG
i bp5	1	LTQSKFUGGAENTAHPRISAPENQSEEGGPCRRHNEASLQELKA	SPRMUP	RAUOL
i bp6	1	PQAGTARPQDUNRQDQQRNPCTSTTPSQPNHAGUQDTEMGPCRRHLDSDLQQLQT	EUYDGA	QTLVU
				PNCCHRG
i bp1n	70	FVHSRQCEISMDGEAGLCUCUYPHNGKRI PG	SPEI	ARGDPHNGQIYFNUQH
i bp2	64	LYNLKOCKNSLNGQGECCUCUNPNITGKLIQG	APT	IRGDPCHL EYNEQCEARGUHTQRMQ
i bp3	68	FVKKKQCRPSKGRKRGFCUCUDKV	GQPLPGYTT	KGKEDUHCYSNQSK
i bp4	53	NFHPKQCHPALDQGRGKCHCUDAKTGUKLPG	GLEPKGELDCHQLADSFRE	
i bp5	65	FVKAQCKPSRGRKRGICUCUDKV	GMKLPG	MEYUDGDFQCITFDSNHUE
i bp6	74	FVAKRQCRSSQGRGCPCHCUDRN	GKSLPG	SPDGNHSSSCPITGSSG

Figur 1

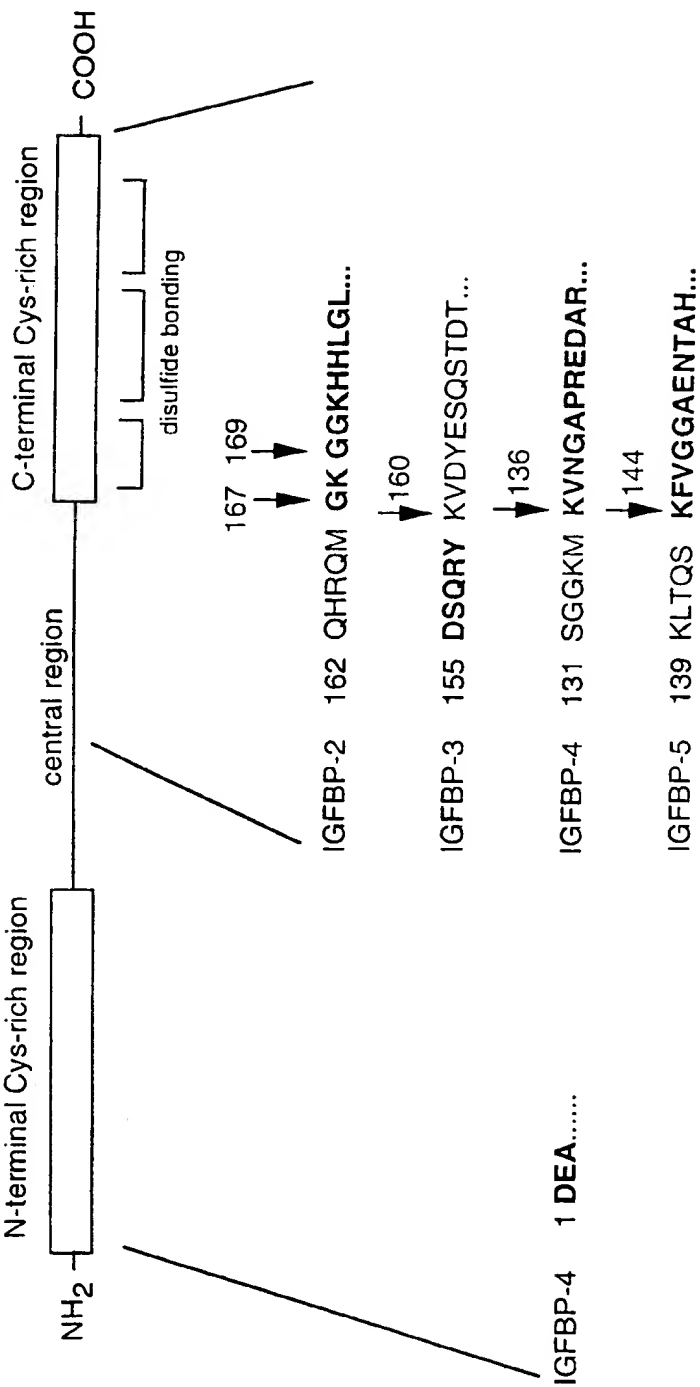
- 2/9 -

Schematische Grundstruktur der IGFBP's
IGFBP 1 - 6

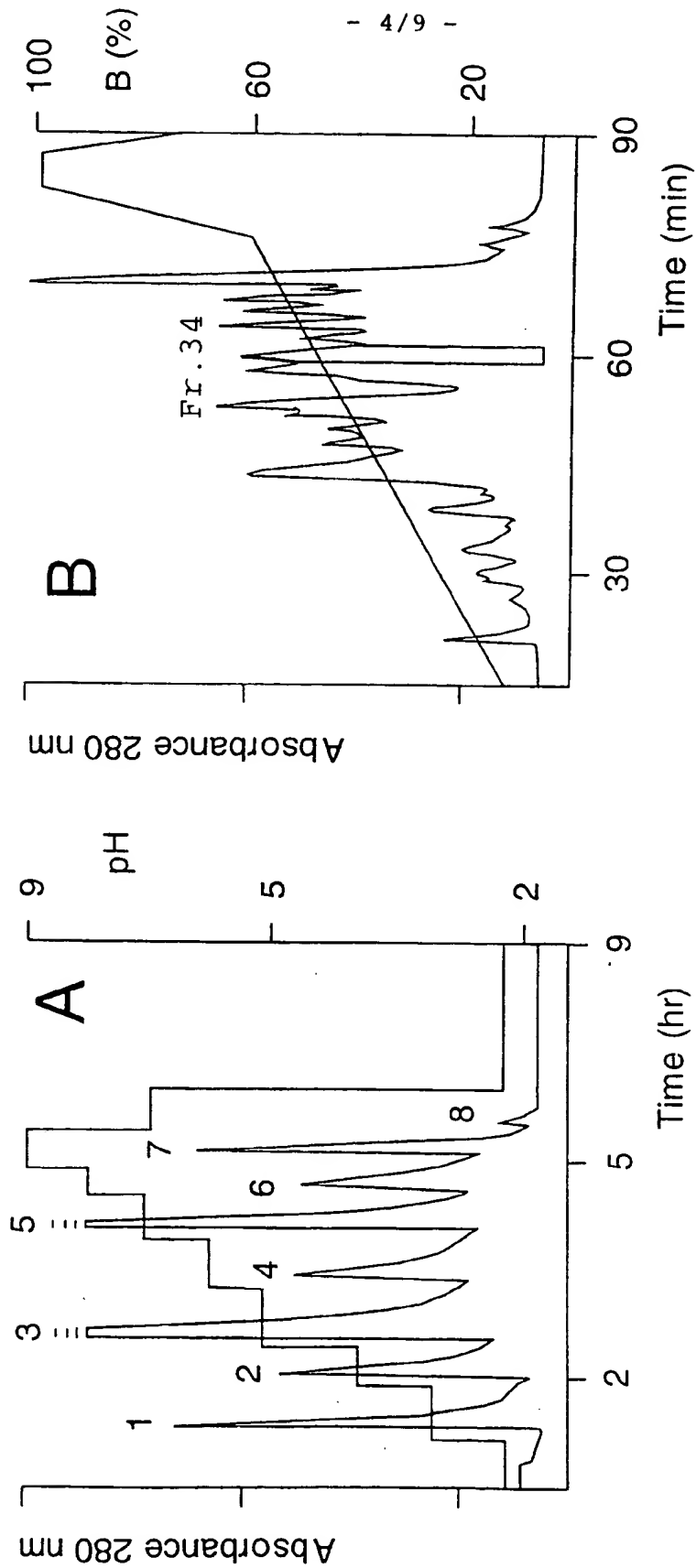
insges. jew. 250 - 350 Aminosäuren



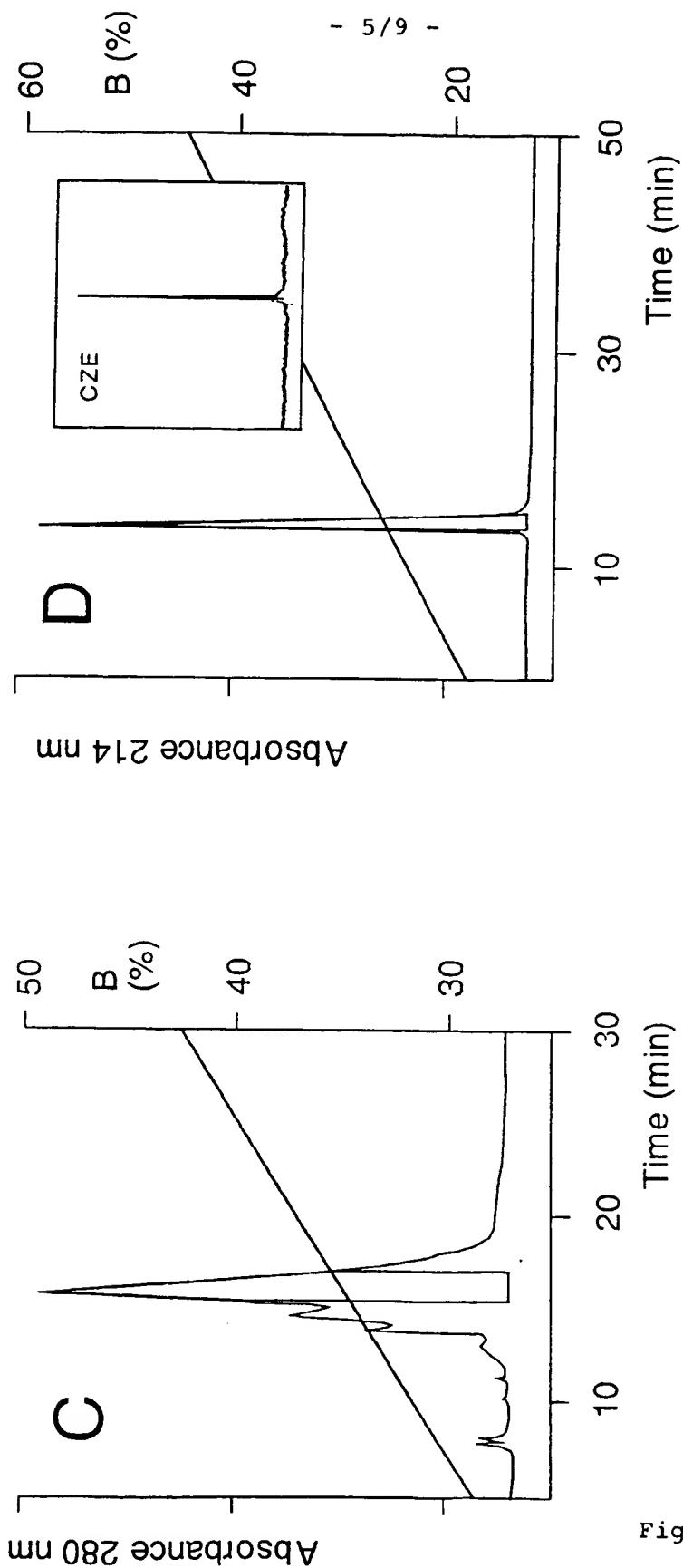
Figur 2



Figur 3



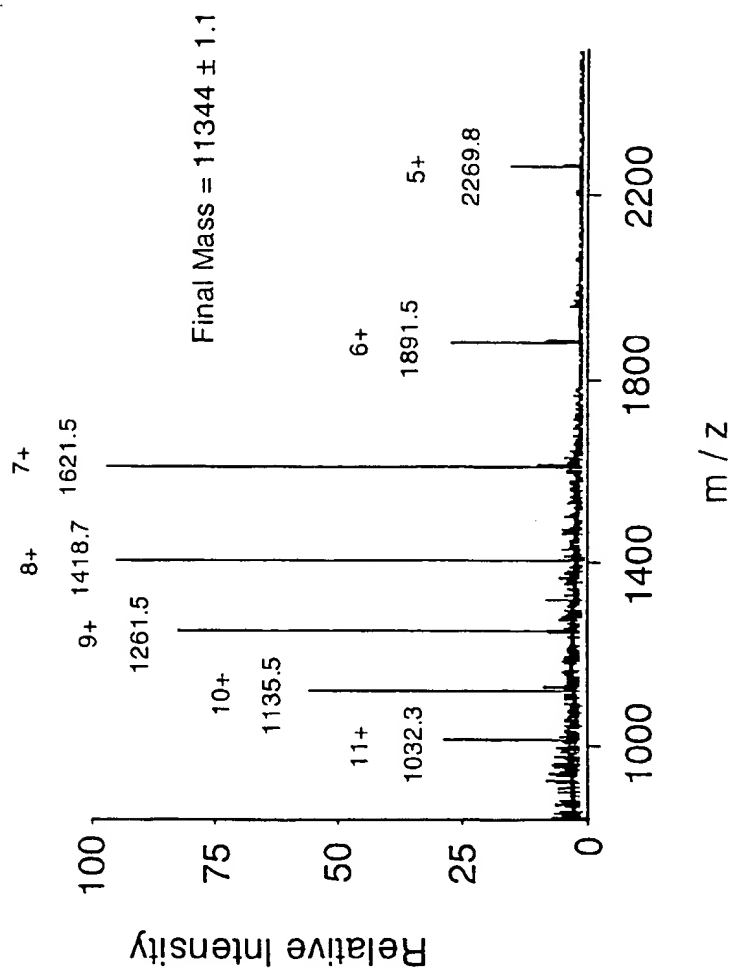
Figur 4a



Figur 4b

- 6/9 -

E

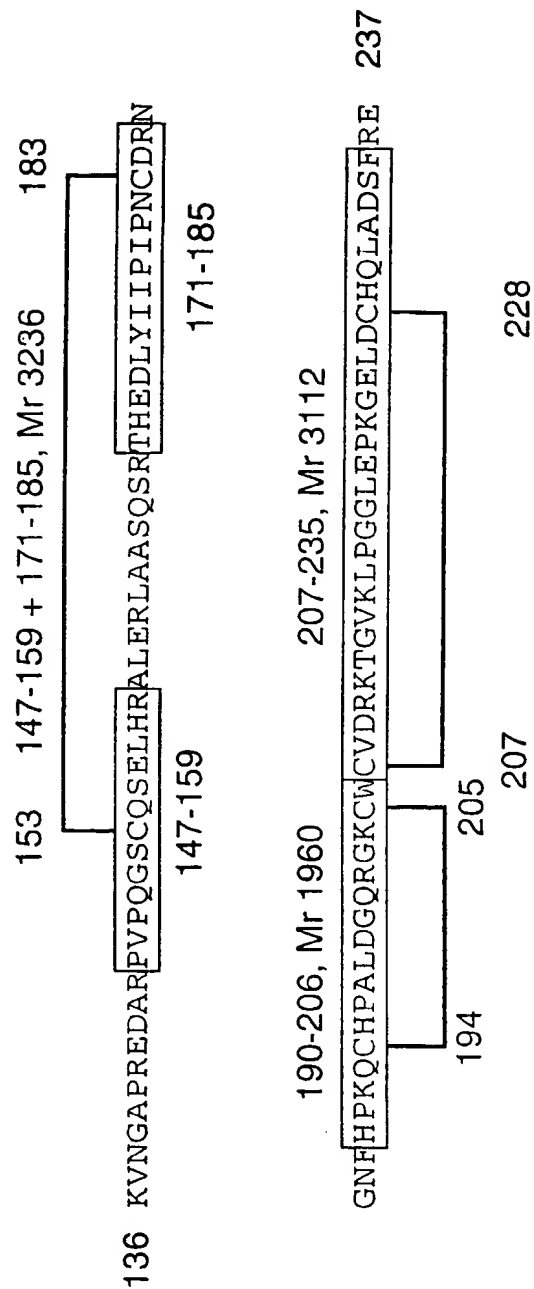


Figur 4c

136-KVNGAPREDARVPVPQGSXQSELHRA

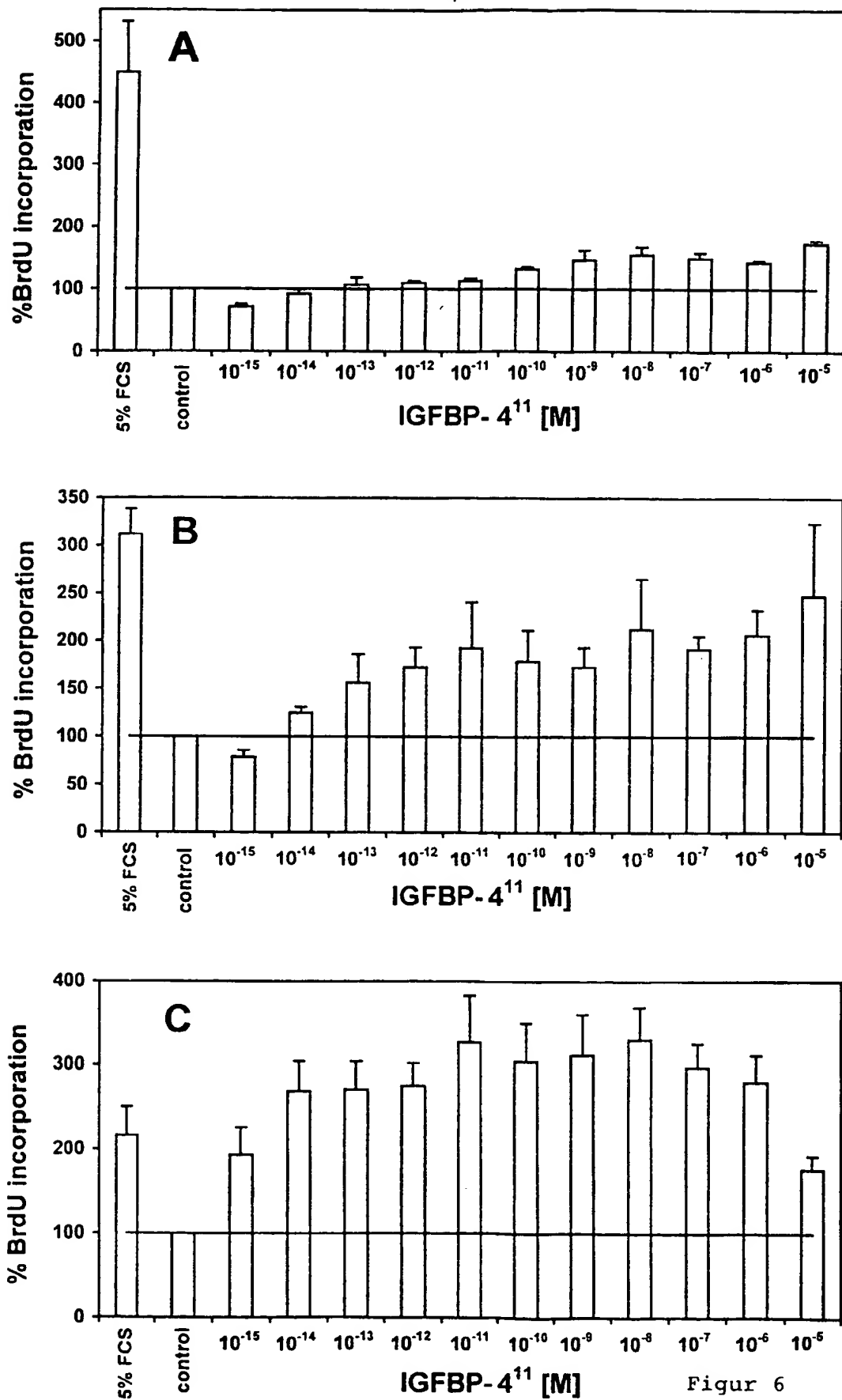
DRSTSGGKMKVNGAPREDARVPVPQGSCQSELHRA

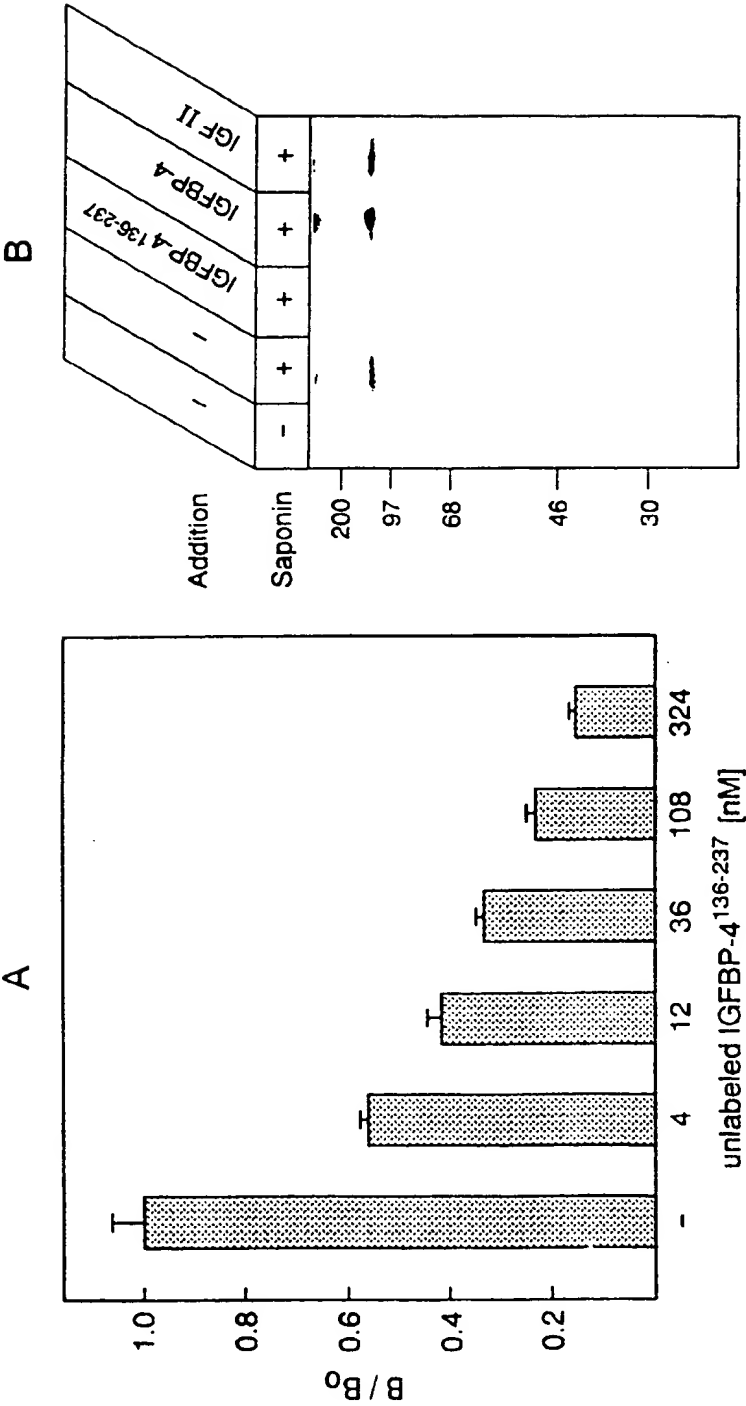
- 7/9 -



Figur 5

- 8/9 -





Figur 7

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Prof. Dr. Wolf-Georg Forssmann
- (B) STRASSE: Feodor-Lynen-Str. 31
- (C) ORT: Hannover
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Insulin-like Growth Factor Binding Protein

Fragmente und ihre Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 50

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Ala	Pro	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Ser	Ile	Leu	Trp	Asp	Ala	Ile	Ser	Thr
1				5					10					15	
Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Ala	Leu	His	Val	Thr	Asn	Ile	Lys	Lys	Trp	Lys
			20					25						30	

Glu Pro

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Gly	Gly	Lys	His	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Glu	Pro	Lys	Lys	Leu	Arg	Pro
1				5					10					15	

Pro Pro Ala Arg Thr Pro

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Gly	Lys	Gly	Gly	Lys	His	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Glu	Pro	Lys	Lys	Leu
1				5				10						15	
Arg Pro Pro Pro Ala Arg Thr Pro															
20															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Gly	His	Ala	Lys	Asp	Ser	Gln	Arg	Tyr	Lys	Val	Asp	Tyr	Glu	Ser	Gln
1			5					10					15		
Ser Thr Asp Thr Gln Asn Phe Ser Ser Glu Ser Lys Arg Glu Thr Glu															
20 25 30															
Tyr Gly Pro															
35															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 17 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Lys	Val	Asn	Gly	Ala	Pro	Arg	Glu	Asp	Ala	Arg	Pro	Val	Pro	Gln	Gly
1			5					10					15		
Ser															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Leu	Thr	Gln	Ser	Lys	Phe	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Asn	Thr	Ala	His	Pro
1				5					10					15	
Arg	Ile	Ile	Ser	Ala	Pro	Glu	Met	Arg	Gln	Glu	Ser	Glu	Gln	Gly	Pro
			20					25					30		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 41 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Pro	Gln	Ala	Gly	Thr	Ala	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Asn	Arg	Arg	Asp	Gln
1				5					10					15	
Gln	Arg	Asn	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Gln	Pro	Asn	Ser	Ala
			20				25					30			
Gly	Val	Gln	Asp	Thr	Glu	Met	Gly	Pro							
		35					40								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Arg	Ile	Glu	Leu	Tyr	Arg	Val	Val	Glu	Ser	Leu	Ala	Lys	Ala	Gln	Glu
1				5					10					15	
Thr	Ser	Gly	Glu	Glu	Ile	Ser	Lys	Phe	Tyr	Leu					
			20				25								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 31 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Gln Gln Glu Leu Asp Gln Val Leu Glu Arg Ile Ser Thr Met Arg Leu

1	5	10	15											
Pro	Asp	Glu	Arg	Gly	Pro	Leu	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Leu	His	Ile
			20					25					30	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Arg	Arg	Glu	Met	Glu	Asp	Thr	Leu	Asn	His	Leu	Lys	Phe	Leu	Asn	Val
1				5					10					15	
Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Val	His	Ile								
			20												

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Gln	Ser	Glu	Leu	His	Arg	Ala	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Ala	Ser	Gln	Ser
1				5					10					15	
Arg	Thr	His	Glu	Asp	Leu	Tyr	Ile	Ile	Pro	Ile					
			20					25							

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Arg	Arg	His	Met	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Ser	Pro	Arg
1				5					10					15	
Met	Val	Pro	Arg	Ala	Val	Tyr	Leu								
			20												

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Arg	Arg	His	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Gln	Gln	Leu	Gln	Thr	Glu	Val	Tyr
1				5				10					15		
Arg	Gly	Ala	Gln	Thr	Leu	Tyr	Val								
				20											

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Asn	Lys	Asn	Gly	Phe	Tyr	His	Ser	Arg
1				5				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Asp	Lys	His	Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Lys
1				5				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Asp	Lys	Lys	Gly	Phe	Tyr	Lys	Lys	Lys
1				5				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:
Asp Arg Asn Gly Asn Phe His Pro Lys
1 5
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:
Asp Arg Lys Gly Phe Tyr Lys Arg Lys
1 5
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:
Asp His Arg Gly Phe Tyr Arg Lys Arg
1 5
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:
Glu Thr Ser Met Asp Gly Glu Ala Gly Leu
1 5 10
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:
 - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Lys Met Ser Leu Asn Gly Gln Arg Gly Glu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Arg Pro Ser Lys Gly Arg Lys Arg Gly Phe
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

His Pro Ala Leu Asp Gly Gln Arg Gly Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Lys Pro Ser Arg Gly Arg Lys Arg Gly Ile
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:
Arg Ser Ser Gln Gly Gln Arg Arg Gly Pro
1 5 10
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:
Tyr Pro Trp Asn Gly Lys Arg Ile Pro Gly Ser Pro Glu Ile Arg Gly
1 5 10 15
Asp Pro Asn
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:
Asn Pro Asn Thr Gly Lys Leu Ile Gln Gly Ala Pro Thr Ile Arg Gly
1 5 10 15
Asp Pro Glu
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:
Asp Lys Tyr Gly Gln Pro Leu Pro Gly Tyr Thr Thr Lys Gly Lys Glu
1 5 10 15
Asp Val His
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

Asp	Arg	Lys	Thr	Gly	Val	Lys	Leu	Pro	Gly	Gly	Leu	Glu	Pro	Lys	Gly
1				5					10					15	
Glu Leu Asp															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Asp	Lys	Tyr	Gly	Met	Lys	Leu	Pro	Gly	Met	Glu	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp
1				5					10					15	
Phe Gln															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

Asp	Arg	Met	Gly	Lys	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Pro	Asp	Gly	Asn	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser Ser															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

Gln Ile Tyr Phe Asn Val Gln Asn

1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

His Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Gln Glu Ala Arg Gly Val His Thr Gln
1 5 10 15
Arg Met Gln

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

His Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Gln Glu
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

Tyr Ser Met Gln Ser Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

His Gln Leu Ala Asp Ser Phe Arg Glu

1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

His Thr Phe Asp Ser Ser Asn Val Glu
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

Pro Thr Gly Ser Ser Gly
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 118 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

Ala Pro Ser Glu Glu Asp His Ser Ile Leu Trp Asp Ala Ile Ser Thr
1 5 10 15

Tyr Asp Gly Ser Lys Ala Leu His Val Thr Asn Ile Lys Lys Trp Lys
20 25 30

Glu Pro Cys Arg Ile Glu Leu Tyr Arg Val Val Glu Ser Leu Ala Lys
35 40 45

Ala Gln Glu Thr Ser Gly Glu Glu Ile Ser Lys Phe Tyr Leu Pro Asn
50 55 60

Cys Asn Lys Asn Gly Phe Tyr His Ser Arg Gln Cys Glu Thr Ser Met
65 70 75 80

Asp Gly Glu Ala Gly Leu Cys Trp Cys Val Tyr Pro Trp Asn Gly Lys
85 90 95

Arg Ile Pro Gly Ser Pro Glu Ile Arg Gly Asp Pro Asn Cys Gln Ile


```

          100          105          110
Tyr Phe Asn Val Gln Asn
          115

```

(2) ANGABEN ZU SEO ID NO: 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

Gly	Lys	Gly	Gly	Lys	His	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Glu	Pro	Lys	Lys	Leu
1				5					10					15	
Arg	Pro	Pro	Pro	Ala	Arg	Thr	Pro	Cys	Gln	Gln	Glu	Leu	Asp	Gln	Val
			20					25					30		
Leu	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Met	Arg	Leu	Pro	Asp	Glu	Arg	Gly	Pro	Leu
		35					40					45			
Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Leu	His	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	Lys	His	Gly	Leu
	50					55					60				
Tyr	Asn	Leu	Lys	Gln	Cys	Lys	Met	Ser	Leu	Asn	Gly	Gln	Arg	Gly	Glu
65					70					75					80
Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Pro	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Ile	Gln	Gly	Ala	Pro
				85					90					95	
Thr	Ile	Arg	Gly	Asp	Pro	Glu	Cys	His	Leu	Phe	Tyr	Asn	Glu	Gln	Gln
			100					105					110		
Glu	Ala	Arg	Gly	Val	His	Thr	Gln	Arg	Met	Gln					
			115				120								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 114 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

Gly His Ala Lys Asp Ser Gln Arg Tyr Lys Val Asp Tyr Glu Ser Gln
1 5 10 15
Ser Thr Asp Thr Gln Asn Phe Ser Ser Glu Ser Lys Arg Glu Thr Glu
20 25 30
Tyr Gly Pro Cys Arg Arg Glu Met Glu Asp Thr Leu Asn His Leu Lys
35 40 45
Phe Leu Asn Val Leu Ser Pro Arg Gly Val His Ile Pro Asn Cys Asp

50		55		60
Lys Lys Gly Phe Tyr Lys Lys Lys Gln Cys Arg Pro Ser Lys Gly Arg				
65	70	75		80
Lys Arg Gly Phe Cys Trp Cys Val Asp Lys Tyr Gly Gln Pro Leu Pro				
	85	90		95
Gly Tyr Thr Thr Lys Gly Lys Glu Asp Val His Cys Tyr Ser Met Gln				
	100	105		110
Ser Lys				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

Lys Val Asn Gly Ala Pro Arg Glu Asp Ala Arg Pro Val Pro Gln Gly				
1	5	10		15
Ser Cys Gln Ser Glu Leu His Arg Ala Leu Glu Arg Leu Ala Ala Ser				
	20	25		30
Gln Ser Arg Thr His Glu Asp Leu Tyr Ile Ile Pro Ile Pro Asn Cys				
	35	40		45
Asp Arg Asn Gly Asn Phe His Pro Lys Gln Cys His Pro Ala Leu Asp				
	50	55		60
Gly Gln Arg Gly Lys Cys Trp Cys Val Asp Arg Lys Thr Gly Val Lys				
65	70	75		80
Leu Pro Gly Gly Leu Glu Pro Lys Gly Glu Leu Asp Cys His Gln Leu				
	85	90		95
Ala Asp Ser Phe Arg Glu				
	100			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 113 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

Leu Thr Gln Ser Lys Phe Val Gly Gly Ala Glu Asn Thr Ala His Pro				
1	5	10		15
Arg Ile Ile Ser Ala Pro Glu Met Arg Gln Glu Ser Glu Gln Gly Pro				

					20					25					30				
Cys	Arg	Arg	His	Met	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Ser	Pro				
					35					40					45				
Arg	Met	Val	Pro	Arg	Ala	Val	Tyr	Leu	Pro	Asn	Cys	Asp	Arg	Lys	Gly				
					50					55					60				
Phe	Tyr	Lys	Arg	Lys	Gln	Cys	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Gly				
					65					70					75				
Ile	Cys	Trp	Cys	Val	Asp	Lys	Tyr	Gly	Met	Lys	Leu	Pro	Gly	Met	Glu				
					85					90					95				
Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Phe	Gln	Cys	His	Thr	Phe	Asp	Ser	Ser	Asn	Val				
					100					105					110				
Glu																			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 119 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

[illegible]

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 121 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

Gly	Gly	Lys	His	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Glu	Pro	Lys	Lys	Leu	Arg	Pro	1	5	10	15
Pro	Pro	Ala	Arg	Thr	Pro	Cys	Gln	Gln	Glu	Leu	Asp	Gln	Val	Leu	Glu	20	25	30	
Arg	Ile	Ser	Thr	Met	Arg	Leu	Pro	Asp	Glu	Arg	Gly	Pro	Leu	Glu	His	35	40	45	
Leu	Tyr	Ser	Leu	His	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	Lys	His	Gly	Leu	Tyr	Asn	50	55	60	
Leu	Lys	Gln	Cys	Lys	Met	Ser	Leu	Asn	Gly	Gln	Arg	Gly	Glu	Cys	Trp	65	70	75	80
Cys	Val	Asn	Pro	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Ile	Gln	Gly	Ala	Pro	Thr	Ile	85	90	95	
Arg	Gly	Asp	Pro	Glu	Cys	His	Leu	Phe	Tyr	Asn	Glu	Gln	Gln	Glu	Ala	100	105	110	
Arg	Gly	Val	His	Thr	Gln	Arg	Met	Gln								115	120		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 105 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

Lys	Val	Asp	Tyr	Glu	Ser	Gln	Ser	Thr	Asp	Thr	Gln	Asn	Phe	Ser	Ser	1	5	10	15
Glu	Ser	Lys	Arg	Glu	Thr	Glu	Tyr	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Glu	Met	Glu	20	25	30	
Asp	Thr	Leu	Asn	His	Leu	Lys	Phe	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	35	40	45	
Val	His	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	Lys	Lys	Gly	Phe	Tyr	Lys	Lys	Lys	Gln	50	55	60	
Cys	Arg	Pro	Ser	Lys	Gly	Arg	Lys	Arg	Gly	Phe	Cys	Trp	Cys	Val	Asp	65	70	75	80
Lys	Tyr	Gly	Gln	Pro	Leu	Pro	Gly	Tyr	Thr	Thr	Lys	Gly	Lys	Glu	Asp	85	90	95	
Val	His	Cys	Tyr	Ser	Met	Gln	Ser	Lys								100	105		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

His	Pro	Leu	His	Ser	Lys	Ile	Ile	Ile	Ile	Lys	Lys	Gly	His	Ala	Lys
1				5					10						15
Asp	Ser	Gln	Arg	Tyr											
				20											

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 135 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

Asp	Glu	Ala	Ile	His	Cys	Pro	Pro	Cys	Ser	Glu	Glu	Lys	Leu	Ala	Arg
1				5					10					15	
Cys	Arg	Pro	Pro	Val	Gly	Cys	Glu	Glu	Leu	Val	Arg	Glu	Pro	Gly	Cys
			20					25					30		
Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Met	Pro	Cys	Gly	Val
		35					40					45			
Tyr	Thr	Pro	Arg	Cys	Gly	Ser	Gly	Leu	Arg	Cys	Tyr	Pro	Pro	Arg	Gly
	50					55					60				
Val	Glu	Lys	Pro	Leu	His	Thr	Leu	Met	His	Gly	Gln	Gly	Val	Cys	Met
65					70					75					80
Glu	Leu	Ala	Glu	Ile	Glu	Ala	Ile	Gln	Glu	Ser	Leu	Gln	Pro	Ser	Asp
				85					90					95	
Lys	Asp	Glu	Gly	Asp	His	Pro	Asn	Asn	Ser	Phe	Ser	Pro	Cys	Ser	Ala
			100					105					110		
His	Asp	Arg	Arg	Cys	Leu	Gln	Lys	His	Phe	Ala	Lys	Ile	Arg	Asp	Arg
		115					120						125		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Lys	Met									
		130				135									

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 109 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

Lys	Phe	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Asn	Thr	Ala	His	Pro	Arg	Ile	Ile	Ser	1	5	10	15
Ala	Pro	Glu	Met	Arg	Gln	Glu	Ser	Glu	Gln	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	His	20	25	30	
Met	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Ser	Pro	Arg	Met	Val	Pro	35	40	45	
Arg	Ala	Val	Tyr	Leu	Pro	Asn	Cys	Asp	Arg	Lys	Gly	Phe	Tyr	Lys	Arg	50	55	60	
Lys	Gln	Cys	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Trp	Cys	65	70	75	80
Val	Asp	Lys	Tyr	Gly	Met	Lys	Leu	Pro	Gly	Met	Glu	Tyr	Val	Asp	Gly	85	90	95	
Asp	Phe	Gln	Cys	His	Thr	Phe	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Glu	100	105					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 23 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

His	Thr	Arg	Ile	Ser	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Lys	Lys	Asp	Arg	1	5	10	15
Arg	Lys	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	20												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/08405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/47 C07K14/65 C07K16/18
A61K31/70 A61K38/17 A61K38/30 A61K39/395 G01N33/68
C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K G01N C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EP 0 725 080 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 7 August 1996</p> <p>see page 3, line 50 - page 4, line 2 see SeqID. 9; see page 8, line 33 - line 37; claims; examples</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1,4-8, 10-14, 16,18, 25-29</p>



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Δ" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 1999

Date of mailing of the international search report

08/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/08405

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>KALUS, WENZEL ET AL: "Structure of the IGF-binding domain of the insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): implications for IGF and IGF-I receptor interactions"</p> <p>EMBO J. (1998), 17(22), 6558-6572 CODEN: EMJODG; ISSN: 0261-4189, 16 November 1998, XP002103022</p> <p>see fragment 135-246 of IGFBP-5</p> <p>see page 6559, left-hand column, paragraph 2; figure 1</p> <p>---</p>	1,3-8, 10-13
X	<p>WO 97 30084 A (GENETICS INST)</p> <p>21 August 1997</p> <p>see SeqID. 6 and claim 11</p> <p>see page 7, line 20 - line 30; claims; examples</p> <p>---</p>	1,4,7,8, 10-14, 16,18, 20,23, 25-29
A	<p>WO 96 02565 A (CELTRIX PHARMA)</p> <p>1 February 1996</p> <p>see claims; examples</p> <p>---</p>	1,23
A	<p>WO 96 01636 A (WERTHER GEORGE ARTHUR ; ROYAL CHILDREN S HOSPITAL RESE (AU); WRAIGH) 25 January 1996</p> <p>see claims; examples</p> <p>-----</p>	1,23

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP 98/08405**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although Claims Nos. 26 and 27 relate to a method for treatment of the human/animal body by therapy, the search was carried out. It was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/08405

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0725080	A	07-08-1996	AU 2753595 A	19-01-1996
			FI 960706 A	12-04-1996
			NO 960766 A	24-04-1996
			NZ 288352 A	19-12-1997
			CA 2169953 A	04-01-1996
			CN 1129944 A	28-08-1996
			WO 9600240 A	04-01-1996
<hr/>				
WO 9730084	A	21-08-1997	US 5843675 A	01-12-1998
			US 5712381 A	27-01-1998
			AU 2268697 A	02-09-1998
			US 5891675 A	06-04-1999
<hr/>				
WO 9602565	A	01-02-1996	AU 3099995 A	16-02-1996
			CA 2195474 A	01-02-1996
			EP 0800530 A	15-10-1997
			JP 10512235 T	24-11-1998
<hr/>				
WO 9601636	A	25-01-1996	AU 692278 B	04-06-1998
			AU 2875395 A	09-02-1996
			CA 2194366 A	25-01-1996
			EP 0776210 A	04-06-1997
			JP 10508286 T	18-08-1998
			NZ 289028 A	26-01-1998
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08405

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C12N15/11 C07K14/47 C07K14/65 C07K16/18
A61K31/70 A61K38/17 A61K38/30 A61K39/395 G01N33/68
C07H21/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N A61K G01N C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 725 080 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 7. August 1996 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 4, Zeile 2 siehe SeqID. 9; siehe Seite 8, Zeile 33 - Zeile 37; Ansprüche; Beispiele --- -/--	1,4-8, 10-14, 16,18, 25-29



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Mai 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/06/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter.ionales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08405

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	KALUS, WENZEL ET AL: "Structure of the IGF-binding domain of the insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): implications for IGF and IGF-I receptor interactions" EMBO J. (1998), 17(22), 6558-6572 CODEN: EMJODG;ISSN: 0261-4189,16. November 1998, XP002103022 siehe Fragment 135-246 des IGFBP-5 siehe Seite 6559, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 1 ----	1,3-8, 10-13
X	WO 97 30084 A (GENETICS INST) 21. August 1997 Siehe SeqID. 6 und Anspruch 11 siehe Seite 7, Zeile 20 - Zeile 30; Ansprüche; Beispiele ----	1,4,7,8, 10-14, 16,18, 20,23, 25-29
A	WO 96 02565 A (CELTRIX PHARMA) 1. Februar 1996 siehe Ansprüche; Beispiele ----	1,23
A	WO 96 01636 A (WERTHER GEORGE ARTHUR ;ROYAL CHILDREN S HOSPITAL RESE (AU); WRAIGH) 25. Januar 1996 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,23

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 26 und 27 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt. Sie gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08405

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0725080 A	07-08-1996	AU 2753595 A	19-01-1996
		FI 960706 A	12-04-1996
		NO 960766 A	24-04-1996
		NZ 288352 A	19-12-1997
		CA 2169953 A	04-01-1996
		CN 1129944 A	28-08-1996
		WO 9600240 A	04-01-1996
WO 9730084 A	21-08-1997	US 5843675 A	01-12-1998
		US 5712381 A	27-01-1998
		AU 2268697 A	02-09-1998
		US 5891675 A	06-04-1999
WO 9602565 A	01-02-1996	AU 3099995 A	16-02-1996
		CA 2195474 A	01-02-1996
		EP 0800530 A	15-10-1997
		JP 10512235 T	24-11-1998
WO 9601636 A	25-01-1996	AU 692278 B	04-06-1998
		AU 2875395 A	09-02-1996
		CA 2194366 A	25-01-1996
		EP 0776210 A	04-06-1997
		JP 10508286 T	18-08-1998
		NZ 289028 A	26-01-1998